

<sup>1</sup> IAP6 Rec'd PCT/PTO 21 AUG 2006

PROCEDE ET DISPOSITIF PERMETTANT DE DETECTER LA  
FORMATION ET LE DEVELOPPEMENT DE BIOFILMS DANS UN MILIEU  
DE CULTURE

5 La présente invention se rapporte au domaine de la  
détection de la viscosité d'un milieu de culture.

La présente invention se rapporte plus  
particulièrement au domaine de l'étude du développement  
d'un biofilm dans un milieu de culture homogène ou non  
10 homogène. Ledit biofilm en se développant entrave le  
mouvement de particules aptes à se déplacer dans un champ  
magnétique, électrique ou électromagnétique, comme des  
particules chargées électriquement (par la présence d'ions  
positifs et/ou négatifs) ou magnétiques ou magnétisables  
15 ou encore recouvertes d'une couche magnétique ou  
magnétisable. .

A cet égard, dans le présent texte, le terme  
"viscosité" doit s'entendre comme faisant référence au  
degré de liberté de la particule magnétisable dans le  
20 biofilm. On comprendra à la lecture du présent texte que  
l'invention n'a pas pour objet une mesure de la viscosité  
d'un milieu comme on aurait pu l'entendre avec le terme  
"viscosité" dans son sens commun, mais bien la mise en  
évidence du développement d'un microorganisme par la  
25 mesure du degré de liberté d'une (ou plusieurs) particules  
magnétisables, dont le mouvement est ou non entravé par un  
biofilm, lui-même significatif de la présence ou non dudit  
microorganisme en développement.

De même l'expression "milieu de culture" doit  
30 s'entendre comme tout milieu dans lequel au moins un  
microorganisme est susceptible d'être présent et de se  
développer. Il s'agit donc d'un milieu qui peut être  
naturel ou synthétique. Ainsi par exemple, l'eau entre  
dans cette définition. Par la suite dans le présent texte

l'expression "milieu de culture" ou les termes "milieu" ou "culture" pourront être employés indifféremment en référence à cette définition.

5 Ainsi par "milieu de culture", "milieu" ou "culture", on entend selon l'invention le microorganisme et le milieu dans lequel il se trouve, ou éventuellement le milieu seul.

10 Un micro-organisme est un être vivant microscopique tel que les bactéries, les levures, les champignons, les algues, les protistes. Un micro-organisme peut être unicellulaire ou pluricellulaire. Des stades larvaires d'organismes pluricellulaires (métazoaires) peuvent aussi être à l'origine de biofilms.

15 La plupart des micro-organismes (pathogènes ou non) ont été étudiés jusqu'ici sous leur forme « planctonique », libres et isolés dans un milieu (cultivés en suspension ou sur milieu sélectif). Or, en milieu naturel, hors laboratoire, les populations bactériennes se trouvent fixées sur un support (état  
20 « sessile ») et se développent en communauté organisée nommée « biofilm ». Cette communauté bactérienne est généralement englobée dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) limitant les échanges avec le milieu environnant (A. Filloux, I. Vallet. Biofilm :  
25 « Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne ». Médecine/Sciences 2003 ; 19: 77-83).

Lorsqu'un biofilm se développe, il y a d'abord adhésion des bactéries sur un support puis colonisation de ce support. Les bactéries en se multipliant forment  
30 rapidement un film constitué par des strates de corps cellulaires sécrétant une gangue d'exopolysaccharides qui les protège des agressions du milieu environnant (Costerton et al. Bacterial Biofilms. Sciences 1999 ; 284-6). La cinétique de formation d'un biofilm peut être subdivisée en

5 étapes :

- Conditionnement de la surface : Les molécules organiques ou minérales présentes dans la phase liquide vont s'adsorber sur la surface, pour y former un « film conditionnant ».

- L'adhérence ou adhésion réversible : Les microorganismes présents se rapprochent des surfaces par gravimétrie, mouvements browniens ou par chimiotactisme s'ils possèdent des flagelles. Au cours de cette première  
10 étape de fixation, faisant intervenir uniquement des phénomènes purement physiques et des interactions physico-chimiques faibles, les microorganismes peuvent encore être facilement décrochés.

- L'adhésion : Cette étape plus lente fait intervenir  
15 des interactions de plus forte énergie ainsi que le métabolisme microbien et les appendices cellulaires du microorganisme (flagelles, pilis, ...). L'adhésion est un phénomène actif et spécifique. Les premiers colonisateurs vont s'attacher de manière irréversible à la surface grâce  
20 notamment à la synthèse d'exopolysaccharides. Ce processus est relativement lent et dépend des facteurs environnementaux et des microorganismes en présence.

- La maturation du biofilm (développement et colonisation de la surface) : Après avoir adhéré à une  
25 surface, les bactéries se multiplient et se regroupent pour former des microcolonies entourées de polymères. Cette matrice de polymères (ou glycocalyx) va agir comme un « ciment » et renforcer l'association des bactéries entre-elles et avec la surface pour finalement former un biofilm  
30 et atteindre un état d'équilibre. Le biofilm se développe généralement en une structure tridimensionnelle qui constitue un lieu de confinement. Ce micro-environnement va être le siège de nombreuses modifications physiologiques et moléculaires par rapport au mode de croissance

planctonique. Le biofilm ainsi formé va occuper toute la surface qui lui est offerte si les conditions le lui permettent. Généralement la maturation du biofilm est corrélée à la production d'EPS même si certaines espèces de microorganismes ne synthétisant pas ou peu de polymères peuvent également adhérer et former des biofilms sur des surfaces.

Décrochement : Les biofilms sont des structures en perpétuel équilibre dynamique et évoluent en fonction du support, des micro-organismes, et de l'environnement. Cette évolution peut se traduire par des décrochements de cellules ou d'agrégats.

Ce relargage de cellules dans le milieu liquide peut permettre par la suite la contamination d'autres surfaces et est en général la cause de nombreuses maladies récurrentes en milieu médical (source de résistances).

La nature des biofilms est très variée, certains sont très riches en ExoPolySaccharide (EPS), d'autres sont principalement constitués de corps bactériens.

En santé humaine, les biofilms sont responsables d'infections de plus en plus difficiles à juguler : sur toute la sphère ORL (conduit auditif, muqueuse nasale, conjonctive de l'oeil ...), sur les dents (apparition de tartre, de caries, ...), sur les bronches, les poumons (chez les patients atteints de mucoviscidose ...), au niveau du tractus urogénital (...).

Ils sont en outre à l'origine de la plupart des pathologies nosocomiales (plus de 10 000 décès par ans) en se formant au niveau de cathéters, ou d'implants (valves cardiaques, hanches artificielles, sondes urinaires ...)(J.W. Costerton, P. Stewart et E.P. Greenberg, Bacterial Biofilms : « A common cause of persistent infections ». Science, vol. 284, pp1318-1322).

Les biofilms sont également présents dans les tours

de réfrigération, responsables d'infections par les Legionelles.

Ils concernent également l'industrie agro-alimentaire pour leur implication dans les cas d'intoxications alimentaires (formation lors de ruptures de la chaîne du froid, développement sur les outils de tranchage, de broyage, sur les surfaces de travail).

De même, les biofilms se développent dans les canalisations, provoquant notamment des phénomènes de corrosion.

Les biofilms se développent aussi à la surface d'objets immergés, comme par exemple des coques de bateaux, à l'origine de problèmes de « fouling » (encrassement de la surface des coques de bateaux à cause de la colonisation des coques par des microorganismes divers).

Il est à noter que les bactéries ne sont pas seules à créer des biofilms : les champignons, les algues, les protozoaires s'organisent également en biofilms.

Les biofilms sont donc omniprésents dans de nombreux domaines, présentant des risques sanitaires et causant des dommages relativement importants.

Cependant, le développement et le comportement de ces biofilms restent mal connus du fait de leur complexité à être étudiée, bien que de nombreuses méthodes d'étude du développement des biofilms sont mises en œuvre.

Les méthodes d'études des biofilms sont encore principalement basées sur la colonisation de pièces de verre ou de plastique immergées dans un milieu de culture contenu dans des flacons sous agitation dans des étuves afin par la suite de les colorer au cristal violet ou de les observer au microscope.

Il existe d'autres méthodes de détection plus complexes, comme par exemple des détections par Micro

balance à cristal de quartz (Q-CMD, Quartz Cristal Microbalance with Dissipation Monitoring), des détections par MTA (Mass Transport Analysis), par UFDR (Ultrasonic Frequency Domain Reflectometry), par PCR in situ (sur gène fonctionnel Amo A), par FISH (hybridation in situ en fluorescence), par CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy), par PAS (Photo Acoustic Spectroscopy), ...

D'autres méthodes encore utilisent des particules/billes magnétiques revêtues de lectine, ou d'anticorps pour isoler les bactéries responsables du développement de biofilm, ceci pour permettre ensuite la caractérisation de ces microorganismes par des méthodes classiques d'immunoanalyse ou par biologie moléculaire (hybridation ou PCR).

De telles méthodes s'avèrent cependant lourdes à mettre en œuvre et restent relativement onéreuses. Par ailleurs, elles ne permettent pas de donner un enseignement suffisamment probant sur le comportement des bactéries et donc la formation et le développement des biofilms. En effet, ces méthodes ne permettent pas le suivi du développement d'un biofilm, qu'il soit principalement constitué de corps cellulaires (type *Listeria*), d'EPS (exopolysaccharide) ou d'une matrice analogue sécrétée par les microorganismes colonisateurs (type *pseudomonas*).

La présente invention se rapporte à un procédé et un dispositif permettant de détecter l'évolution de la viscosité d'un milieu de culture, homogène ou non homogène, trouble et/ou opaque et à l'utilisation dudit procédé et/ou dudit dispositif dans des applications particulières.

Le terme de « milieu de culture non homogène » doit être compris, dans la présente Demande, dans son sens le plus large. En particulier, un milieu de culture non

homogène pourra consister en un milieu de culture limpide dans lequel évoluent des microorganismes en suspension.

On connaît de l'art antérieur la demande de brevet français FR2555316. Cette demande de brevet porte sur un  
5 procédé et un dispositif pour déterminer la viscosité d'un milieu fluide, le procédé consistant à immerger une bille conductrice dans le milieu fluide, à appliquer à la bille un champ magnétique tournant sensiblement centré sur celle-ci, le champ tournant étant tel que l'écoulement du  
10 fluide au contact de la bille mise en rotation demeure laminaire, et à déterminer une grandeur reliée au couple exercé sur la bille du fait de la viscosité du milieu fluide. Ainsi, la bille, plongée dans un milieu visqueux, subit un moment de freinage proportionnel à la viscosité, et prend en régime permanent une rotation dont la période  
15 est également proportionnelle à la viscosité du milieu liquide à analyser. La rotation de la bille peut être visualisée à l'aide des tâches de diffraction obtenues par éclaircissement de la bille à l'aide d'un faisceau laser selon son axe de rotation.  
20

Cependant, un tel procédé n'est adapté que pour une mise en œuvre dans un milieu visqueux homogène. Or, un milieu de culture de bactéries est opalescent, trouble et opaque. Cette méthode ne permet donc pas de déterminer la  
25 formation ou non de biofilms dans le milieu de culture.

Il est également proposé dans l'abrégé de la demande de brevet japonais JP61161436 une méthode de mesure de la viscosité d'un fluide non-newtonien reposant sur le principe de l'attraction magnétique. La méthode consiste à  
30 mesurer la viscosité au moyen de la mesure du déplacement et de la vitesse de déplacement d'un barreau aimanté sous l'effet d'un champ magnétique.

La méthode proposée dans l'abrégé japonais permet de déterminer les caractéristiques relatives au fluide

visqueux comme la viscosité. Cependant, la méthode en question ne permet en aucune manière de reproduire le comportement d'un microorganisme, tel qu'une bactérie, évoluant dans le fluide visqueux.

5

La présente invention a donc pour objet de proposer un procédé et un dispositif permettant de modéliser le développement des biofilms dans un milieu non homogène, trouble et opaque correspondant au milieu de culture dans lequel les microorganismes se développent pour former de tels biofilms.

La présente invention a également pour but de permettre la modélisation du processus de colonisation d'une surface par des microorganismes.

La présente invention a également pour but de permettre la mise en évidence des différences de viscosité dans un milieu non homogène, et par conséquent de permettre la modélisation du milieu de culture en différentes zones selon le développement de biofilms dans chaque zone.

La présente invention a également pour objet de proposer un procédé et un dispositif de détection du développement des biofilms de mise en œuvre simple, peu onéreuse et automatisable.

Pour ce faire, la présente invention est du type décrit ci-dessus et elle est remarquable, dans son acception la plus large.

Ainsi l'invention a pour objet un procédé permettant de mesurer la viscosité d'un milieu de culture de microorganismes (5), comportant les étapes consistant successivement à :

a) immerger au moins une particule chargée électriquement, magnétique ou magnétisable ou recouverte d'au moins une couche magnétique ou magnétisable dans



ladite culture,

b) soumettre ladite culture à un champ électrique, magnétique ou électromagnétique, et de préférence magnétique, de façon à mettre ladite particule en  
5 mouvement,

c) détecter optiquement le degré de liberté de mouvement de ladite particule dans ladite culture, de préférence par mesure optique, ledit procédé n'utilisant pas de microscope à balayage.

10 L'étape b) consiste à soumettre ladite culture soit à un champ électrique, soit à un champ magnétique, soit à un champ électromagnétique, éventuellement appliqué par impulsion, soit à une augmentation progressive d'un champ électromagnétique, soit à des variations plus complexes de  
15 champ électromagnétique soit à une combinaison de champs.

L'augmentation progressive du champ électromagnétique est obtenue, selon une configuration particulière de l'invention, par rapprochement d'un aimant selon une trajectoire rectiligne ou sinusoïdale, ou bien selon un  
20 mouvement oscillant présentant ou non une amplitude d'oscillation et une fréquence variables. Les variations plus complexes du champ électromagnétique sont obtenues par rotation, ou par des combinaisons de mouvements d'un barreau aimanté à proximité de ladite culture.

25 Avantageusement, ledit champ électrique, magnétique ou électromagnétique est généré par des moyens générateurs de champ en mouvement.

Avantageusement, la culture s'écoule en flux constant ou en flux discontinu à intervalle de temps donné à  
30 travers un réacteur ouvert. Cette dernière configuration est préférée dans la mesure où elle permet une adéquation avec les conditions naturelles du développement d'un biofilm.

Selon l'invention, en ce qui concerne la particule,

cette dernière peut être, soit une particule chargée électriquement, soit une particule magnétique, soit une particule revêtue d'au moins une couche magnétique, soit une particule magnétisable, soit une particule revêtue d'un couche magnétisable.

Avantageusement, ladite particule magnétique peut présenter une taille sensiblement identique à la taille des microorganismes générant les biofilms.

Avantageusement encore, on peut utiliser des particules de tailles différentes et/ou, avantageusement aussi, de couleurs différentes. Les particules de plus petite taille sont immobilisées avant les particules de plus grande taille lors du développement d'un biofilm. On peut ainsi caractériser plus précisément le développement dudit biofilm ou sa dégradation.

De même, selon une configuration avantageuse de l'invention, ladite particule est génératrice d'un signal détectable par ledit dispositif de détection optique du mouvement. Ledit signal peut être détecté soit de façon autonome (avantageusement par radioactivité), soit par ré-émission d'énergie transmise en flux continu ou discontinu (avantageusement transmission d'énergie lumineuse par faisceau laser et ré-émission de fluorescence).

Avantageusement, ladite particule est de type fluorescente, phosphorescente, radioactive ou chimioluminescente.

Selon un mode préférentiel de l'invention, l'étape c) consiste à éclairer au moyen d'une source lumineuse ladite particule et à détecter le mouvement de ladite particule dans ladite culture.

Pour ce faire, ladite particule pourra avantageusement être fluorescente.

Selon une configuration préférée, ladite particule

(3) est configurée de telle sorte qu'elle est en position stable au repos (en l'absence de champ) dans ledit réacteur (1). Avantageusement, ladite particule peut être une particule par exemple en forme de palet, de géométrie asymétrique avec une face plane, (...).

Selon un mode de mise en œuvre particulier de l'invention, ledit procédé consiste en outre à réaliser une mesure de la viscosité de ladite culture, selon le procédé tel que décrit précédemment, à un temps  $t=0$  correspondant à l'ensemencement de ladite culture, et au moins une mesure à un temps  $t$  de la viscosité de ladite culture selon le procédé tel que décrit précédemment, ainsi qu'à comparer lesdites mesures à  $t_0$  et  $t$ .

Le procédé selon l'invention permet de mesurer la viscosité d'une culture de microorganismes homogène ou non homogène, de préférence non homogène.

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet un dispositif permettant la réalisation du procédé selon l'invention, tel que décrit précédemment.

Ainsi, la présente invention a pour objet un dispositif permettant de mesurer la viscosité d'une culture de microorganismes, homogène ou non homogène, comprenant :

- au moins un réacteur de culture destiné à recevoir ladite culture pour réaliser la détection de la formation et du développement de biofilms,

- au moins une particule chargée électriquement ou magnétique ou magnétisable ou recouverte d'au moins une couche magnétique ou magnétisable, immergée dans la culture,

- des moyens pour générer un champ électrique, magnétique ou électromagnétique, de préférence un champ magnétique, ledit champ étant appliqué à ladite particule de façon à la mettre en mouvement,

- un dispositif de détection optique du mouvement de ladite particule, autre qu'un microscope à balayage.

Par réacteur de culture, on entend soit une enceinte présentant au moins une extrémité fermée, du type tube, puit, (...) (réacteur fermé), soit une enceinte présentant ~~deux ouvertures pour permettre l'écoulement de~~ ladite culture au travers de ladite enceinte (réacteur ouvert).

Selon une première configuration de l'invention, ledit réacteur présente une extrémité fermée de sorte à former un fond plat.

Afin de présenter une position stable au fond du tube lorsque la particule est au repos, c'est-à-dire lorsque aucun champ n'est généré, le fond dudit réacteur peut présenter une ou plusieurs cavités ou sillons destinés à recevoir la ou lesdites particule(s).

Selon une deuxième configuration de l'invention, ledit réacteur présente une extrémité fermée de sorte à former un fond hémisphérique.

Selon une autre configuration de l'invention, le réacteur peut présenter deux extrémités ouvertes. Dans cette configuration, ledit réacteur peut être configuré pour permettre un écoulement de ladite culture en flux constant ou en flux discontinu à intervalle de temps donné.

En ce qui concerne ladite particule, cette dernière est, avantageusement, soit une particule chargée électriquement (par la présence d'ions positifs et/ou négatifs), soit une particule magnétique, soit une particule revêtue d'au moins une couche magnétique, soit une particule magnétisable, soit une particule revêtue d'au moins une couche magnétisable.

Avantageusement, ladite particule magnétique présente une taille sensiblement identique à la taille des microorganismes générant les biofilms.

Avantageusement, on peut utiliser des particules de tailles différentes et, avantageusement aussi, de couleurs différentes. Les particules de plus petite taille sont immobilisées avant les particules de plus grande taille  
5 lors du développement d'un biofilm. On peut ainsi caractériser plus précisément le développement dudit biofilm ou sa dégradation.

De même, selon une configuration avantageuse de l'invention, ladite particule est génératrice d'un signal  
10 détectable par ledit dispositif de détection optique du mouvement. Avantageusement, ladite particule est de type fluorescente ou phosphorescente ou radioactive ou chimioluminescente.

Concernant ledit dispositif de détection optique du mouvement, Celui-ci comporte une source lumineuse  
15 émettant en direction de ladite particule, et des moyens de détection optiques permettant de détecter le mouvement de ladite particule dans la culture. Par moyens de détection optiques, on entend tout moyen de détection  
20 utilisable. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agira de moyens optiques macroscopiques. Selon un mode particulier de l'invention, le mouvement de la particule pourra être visualisé directement, à l'œil nu.

Dans le cadre de cette détection, la particule  
25 éclairée pourra consister en une particule fluorescente ou une particule noire, ou tout du moins opaque.

Avantageusement, on pourra utiliser des particules de couleurs différentes, de tailles différentes, de densités différentes, de formes/géométries différentes, de  
30 constitutions physico-chimiques différentes, d'états de surface différents pour multiplier les critères de caractérisation de développement d'un biofilm.

Avantageusement, on pourra coupler à la surface des particules des groupements chimiques à tester et tester

les propriétés anti-adhésion desdits groupements chimiques (particules mobiles).

Avantageusement, on pourra coupler à la surface des particules des molécules permettant de caractériser  
5 certaines catégories de microorganismes et tester  
~~l'adhésion desdites catégories de microorganismes~~  
(particules immobilisées).

Ladite particule pourra être directement configurée pour rester dans une position stable au repos dans le fond  
10 plat dudit réacteur. Avantageusement, ladite particule peut être une particule par exemple en forme de palet, de géométrie asymétrique avec une face plane, (...).

Avantageusement, ledit dispositif peut comprendre en outre des moyens de mesure pour mesurer la viscosité de  
15 ladite culture à des intervalles de temps donnés et des moyens de comparaison permettant de comparer les mesures obtenues.

De cette manière, il peut être testé l'entrave au déplacement de ladite particule due à la présence des  
20 microorganismes colonisateurs, ou d'exopolysaccharides ou de matrice sécrétée par les microorganismes dans laquelle ladite particule est enchâssée à différents temps.

On comprendra mieux l'invention à l'aide de la description, faite ci-après à titre purement explicatif,  
25 de différents modes de réalisation de l'invention, en référence aux figures annexées :

- la figure 1 illustre le principe de détection de la formation et du développement du biofilm dans un tube à fond hémisphérique ;

30 - la figure 2 représente le principe de la détection de la formation d'un biofilm sur le fond d'un tube à fond hémisphérique (ou de tubes autres qu'à fond plat)(vue de dessus).

- la figure 3 illustre le principe de détection de

la formation et du développement du biofilm dans un tube à fond plat ;

- la figure 4 illustre le principe de détection de la formation et du développement du biofilm dans un tube  
5 aux extrémités ouvertes ;

- la figure 5 représente une autre illustration du principe de détection de la formation et du développement du biofilm dans un réacteur (1) du type tube (1) à fond (2) plat.

10 - la figure 6 représente une variante de l'invention présentée à la figure 5.

- la figure 7 représente une application particulière de l'invention telle que décrite dans la figure 5.

15 - la figure 8 représente une application particulière de l'invention dans le domaine de la surveillance de la contamination des canalisations, particulièrement dans la surveillance de la contamination des vannes.

20 Le principe général pour détecter la formation et le développement d'un biofilm dans une culture contenant des microorganismes se déroule comme suit.

Une ou plusieurs particules ou billes chargées électriquement, magnétique(s), magnétisable(s) ou  
25 revêtue(s) d'une couche magnétique ou magnétisable est (sont) placée(s) dans la culture. La composition des particules pourra varier à condition qu'elle soit compatible avec une réactivité dans un champ électrique, magnétique ou électromagnétique. Afin d'alléger la  
30 description qui suit, on ne décrira lesdites particules qu'en terme de billes.

Lesdites billes vont alors se retrouver incorporées petit à petit dans la matrice sécrétée par les microorganismes, jusqu'à une immobilisation complète.

Dans le processus biologique de la formation du biofilm, les microorganismes sont immobilisés et englobés dans cette matrice. Ils sont alors dissimulés, protégés des agressions du milieu extérieur, d'où l'origine des  
5 résistances aux antibiotiques observées (pathologies nosocomiales). Les billes permettent de mimer cette immobilisation.

Afin de mimer cette immobilisation, un générateur de champ est approché vers lesdites billes. Ainsi, dans les  
10 milieux où aucun biofilm ne s'est développé, les billes réagissent à l'approche dudit générateur et se déplacent, en général vers le générateur de champ et éventuellement selon le mouvement dudit générateur. En revanche, si les  
15 particules sont englobées dans la matrice du biofilm, leur mouvement sera freiné, voire empêché selon le degré de formation du biofilm.

La méthode selon la présente invention réside donc dans l'exploitation du comportement de billes pouvant être mises en mouvement sous l'effet de champs, électriques,  
20 magnétiques ou électromagnétiques. Si le comportement desdites billes est entravé par la présence de la matrice qui compose le biofilm, il est alors possible de détecter et de visualiser leur degré de mobilité (mobiles, semi mobiles, immobiles), et par conséquent de visualiser le  
25 développement du biofilm.

Ladite méthode permet en outre de différencier les billes pouvant être mises en mouvement sous l'effet d'un champ et celles dont les mouvements sont entravés par la présence de la matrice sécrétée par les microorganismes.

30 La détection du mouvement des billes dans le biofilm est effectuée par mesure optique, soit par éclairage direct, soit par éclairage indirect. Dans ce dernier cas, les billes utilisées seront avantageusement fluorescentes.



En fonction du format choisi des billes (géométrie, taille, densité), le corps bactérien sera mimé plus ou moins précisément et l'évolution du biofilm caractérisée avec de nouveaux critères.

5 En fonction de la fréquence de présentation du ~~générateur de champ~~, en fonction de la force du champ, l'évolution dynamique de la matrice constitutive du biofilm pourra être suivie. De même, une fois un biofilm constitué, la dégradation de ce dernier pourra être suivie  
10 sous l'effet d'un traitement particulier.

Il est alors possible, avec des tests biochimiques, d'analyser la constitution de ladite matrice.

De même, le suivi de l'immobilisation de la bille par la matrice constituant le biofilm permet de suivre par  
15 analogie le processus d'enfouissement des bactéries dans cette matrice qu'elles sécrètent.

Afin de tester le développement de biofilm au fond d'un tube, la détection sera conduite avec des particules suffisamment denses pour sédimenter au fond dudit tube.  
20 Inversement, la détection sera conduite avec des particules peu denses pour flotter en surface du milieu de culture, ceci afin d'étudier le développement de biofilm en surface (interface air/liquide).

En outre, en jouant sur la densité des particules, des séries de détection peuvent être conduites à des  
25 interfaces solide/liquide, liquide/liquide, liquide/gaz.

Les détections peuvent également mettre en œuvre des particules de tailles différentes, pouvant en outre être, par exemple, différenciées par des couleurs différentes.

30 Des exemples de mise en œuvre de cette méthode vont maintenant être décrits. Dans ces exemples, les microorganismes décrits sont des bactéries. Il est entendu que la description qui suit est applicable à tout autre microorganisme pour lequel on voudra étudier le

développement du biofilm. Cependant, la taille des billes sera avantageusement adaptée à la taille des microorganismes étudiés si l'on souhaite modéliser le comportement des microorganismes dans le biofilm formé.

5 Les figures 1 à 8 illustrent le principe de détection ~~de la formation d'un biofilm dans différentes géométries~~ de tubes recevant une culture comprenant les bactéries à étudier.

10 La figure 1 et la figure 2 illustrent en particulier le principe de détection de la formation et du développement du biofilm dans un réacteur (1) du type tube (1) à fond (2) hémisphérique. La figure 1 est une illustration en coupe, la figure 2 est une vue de dessus.

15 Par exemple, l'expérience peut être conduite sur une plaque présentant 96 tubes (ou puits) de contenance de 200 $\mu$ l. Dans le présent exemple, une bille (3) est déposée au fond de chaque tube (1). Bien entendu, le procédé ne se limite pas nécessairement à une seule bille. Un milieu de culture (4) est alors ajouté dans chacun des tubes (1), ce milieu étant ensuiteensemencé avec une souche bactérienne (5) pouvant évoluer en biofilm (6) et ce, dans des conditions de cultures standardisées (température, oxygénation, pH ...).

20 A intervalle de temps régulier, un aimant (7) positionné sous le tube (1), et plus particulièrement sous la bille (3), se déplace pour remonter régulièrement le long de la paroi dudit tube (1).

30 Lorsque la bille (3) ne rencontre pas d'obstacle dans son mouvement ou n'est pas suffisamment entravée dans la matrice sécrétée par les bactéries (5) et constituant le biofilm (6), la bille (3) suit le mouvement dudit aimant (7) (Figures 1b et 1c ou 2b et 2c). Lorsque l'aimant est éloigné, la bille n'est plus soumise à son champ et peut retourner à sa position initiale. En revanche, lorsque la

formation du biofilm (6) est telle que le mouvement de la bille (3) est entravé voire empêché, ladite bille (3) reste immobile au fond du tube (1) (Figure 1d ou 2d). Cet état traduit alors un développement de la matrice  
5 extracellulaire constitutive du biofilm (6) dans le tube (1) tel que ladite matrice englobe la bille (1) de la même façon qu'elle englobe les bactéries (5).

Dans cet exemple, l'aimant est manipulé de façon à déplacer la bille (3) le long de la paroi dudit tube (1).  
10 Cependant, il pourra être avantageux de manipuler l'aimant en direction de la bille (3) ou inversement, de manipuler le tube vers l'aimant, de sorte à déplacer la bille (3) selon une trajectoire autre que la paroi dudit tube (1).

Avantageusement, un dispositif optique permet de  
15 visualiser automatiquement le degré de liberté de ladite bille (non représenté). Ledit dispositif comprend une source lumineuse émettant en direction de ladite bille (3) et des moyens de détection permettant de détecter le mouvement de la bille (3) dans la culture (4).

Lorsque le tube (3) est transparent, la source lumineuse est disposée sous ledit tube (1) de sorte à émettre le faisceau lumineux directement vers la bille magnétique (3). Les moyens de détection sont alors disposés au-dessus dudit tube (3). Ainsi, la détection du  
20 mouvement de la bille (3) est effectuée en suivant le mouvement de la tâche sombre correspondant à la bille (3).

Lorsque le tube (1) est en matériau opaque, comme par exemple en métal, la source lumineuse est disposée au-dessus dudit tube de sorte à émettre le faisceau lumineux  
25 au travers de la culture (4) vers la bille magnétique (3). De même que précédemment, lesdits moyens de détection sont disposés au-dessus dudit tube. Dans cette configuration, lesdites billes (3) sont constituées avantageusement en matériau fluorescent. Ainsi, lorsque lesdites billes (3)

sont éclairées via la source lumineuse, leur mouvement est détecté par lesdits moyens de détection en suivant le mouvement de la tâche fluorescente correspondant à la bille (3).

5 La figure 3 illustre une variante de réalisation de l'invention : la détection de la formation du biofilm (6) dans un réacteur (1) du type tube (1) à fond (2) plat.

Avantageusement, le fond (2) du tube (1) est muni de deux cavités (8, 9) adjacentes. Une bille (3) est déposée  
10 au temps initial dans une desdites cavités (8). L'aimant (7) est alors disposé au contact de l'autre cavité (9). Lorsque la bille (3) n'est pas entravée dans son mouvement par le biofilm (6), elle glisse de la cavité (8) à la cavité adjacente (9) (Figure 3b). L'aimant (7) est ensuite  
15 déplacé sous la première cavité (8) (Figure 3c). Sous l'effet attractif de l'aimant (7), son mouvement n'étant toujours pas empêché, ou tout du moins pas suffisamment entravé, la bille (3) glisse vers ladite première cavité (8). Et le test va être répété à intervalles réguliers  
20 jusqu'à observer l'immobilisation totale ou partielle des billes (3) comme l'illustre la figure 3d : lorsque l'aimant (7) est déplacé sous la deuxième cavité (9), la bille (3), engluée dans le biofilm (6), ne peut plus, en réponse à l'effet attractif de l'aimant (7), passée dans  
25 la deuxième cavité (9) du fait de l'entravement de son mouvement dans ledit biofilm (6).

Dans une variante, le fond du tube ne présente pas de cavités destinées à recevoir la ou les billes magnétiques. A cet effet, ladite bille magnétique (3) est configurée  
30 pour pouvoir se maintenir dans une position stable au fond dudit tube (1).

La figure 4 illustre un autre mode de réalisation de l'invention mettant en œuvre un réacteur (1) du type tube (1) présentant des extrémités ouvertes (10, 11). Le tube

(1) est alors configuré pour permettre un flux continu du milieu de culture (5).

Comme dans l'exemple du tube à fond plat, la surface interne (12) de la paroi (13) dudit tube (1) présente  
5 avantageusement des cavités (8, 9) pour recevoir la ou lesdites bille(s) (3). Selon le même principe que celui décrit précédemment, un aimant (7) est présenté de façon à mettre en mouvement les billes (3) de façon à ce qu'elles passent d'une cavité à l'autre.

10 Dans le cas où aucune cavité n'est formée à la surface interne (12) de la paroi (13) dudit tube (1), le principe sera similaire à celui décrit pour le tube à fond hémisphérique : l'aimant (7) est présenté et déplacé de façon à remonter lesdites billes sur la face interne (12)  
15 de la paroi (13) dudit tube (1).

Selon une configuration particulière de l'invention, les billes enchâssées dans le biofilm (6) peuvent être par la suite récupérées par un aimant plongeant dans la culture. De cette sorte, un fragment du biofilm est  
20 prélevé et destiné à des tests de caractérisation physique (viscosité de la matrice ...), chimique, biochimique (éléments constitutifs de la matrice, ...), biologique (microorganismes constitutifs de la matrice en état de latence, en activité, corps morts, ...).

25 La figure 5 est une autre illustration du principe de détection de la formation et du développement du biofilm dans un réacteur (1) du type tube (1) à fond (2) plat. Cette illustration est une vue en plan depuis le sommet du tube.

30 Des billes (3) sont déposées au fond de chaque tube (1). Un milieu de culture (4) est alors ajouté dans chacun des tubes (Figure 5a), ce milieu étant ensuiteensemencé avec une souche bactérienne (5) pouvant évoluer en biofilm (6) (Figure 5b à 5e) et ce, dans des conditions de

cultures standardisées (température, oxygénation, pH ...).

A intervalle de temps régulier, un aimant (7) positionné sous le tube (1) (Figure 5b et 5e). Lorsque les billes (3) ne rencontrent pas d'obstacle dans leur mouvement ou ne sont pas suffisamment entravées dans la matrice sécrétée par les bactéries (5) et constituant le biofilm (6), elles sont attirées en direction de l'aimant (7) (Figure 5b). Les billes (3) attirées autour de l'aimant (7) libèrent une zone « sans billes » ou « zone claire » simple à détecter, particulièrement de manière visuelle. Lorsque la formation du biofilm (6) est telle que le mouvement des billes (3) est entravé voire empêché, les dites billes (3) restent immobiles au fond du tube (1) (Figures 5d et 5e). Cet état traduit alors un développement de la matrice extracellulaire constitutive du biofilm (6) dans le tube (1) tel que ladite matrice englobe la bille magnétique (3) de la même façon qu'elle englobe les bactéries (5).

La figure 6 illustre une variante de l'invention présentée à la figure 5.

Des boîtes de Pétri (1) contenant un milieu de culture liquide (4) sontensemencées avec des bactéries (5) et des billes magnétiques (3 et 3') de tailles différentes sont déposées dans chaque boîte (1) (Figure 7). Les conditions de cultures sont standardisées (température, oxygénation, pH, ...) afin de permettre le développement des bactéries et donc le développement du biofilm (6).

A intervalle de temps régulier, un aimant (7) est positionné sous la boîte de Pétri (1). Lorsque la bille (3) ne rencontre pas d'obstacle dans son mouvement ou n'est pas suffisamment entravée dans la matrice sécrétée par les bactéries (5) et constituant le biofilm (6), les billes magnétiques (3) sont attirées en direction de

l'aimant (7). Une zone claire (14) se dessine alors entre la limite extérieure de la zone d'influence des lignes de champ magnétique (9) qui attirent les billes et l'agrégat de billes (15). Lorsque la formation du biofilm (6) est  
5 telle que le mouvement des billes (3) est entravé voire empêché, les dites billes (3) restent immobiles dans la boîte (1). Cependant, du fait de la taille différente des billes, leur déplacement est fonction de leur taille et de la densité du biofilm. Au fur et à mesure du développement  
10 du biofilm, les petites billes en premier verront leur déplacement inhibé par le biofilm, puis avec un développement supplémentaire du biofilm, les grosses billes se verront à leur tour stoppées.

La figure 7 illustre une application particulière de  
15 l'invention telle que décrite dans la figure 5 ou dans la figure 6, les billes sont déposées sur une surface recouverte d'un produit contenant un agent antimicrobien, comme par exemple un agent antifouling. Ladite surface peut être en tout matériau, particulier en métal.  
20 Lorsqu'un aimant est approché de la surface les billes sont attirées par les lignes de forces de l'aimant, constituant alors une zone de densité en bille plus importante que sur le reste de la surface. Cette application est avantageuse quand on veut mesurer  
25 l'efficacité d'un produit antifouling appliqué sur une surface métallique.

Dans cette forme de réalisation particulière, il peut être plus intéressant de faire varier l'intensité du champ magnétique, par exemple en faisant tourner un barreau  
30 aimanté sous la surface à tester.

La figure 8 illustre une application particulière de l'invention dans le domaine de la surveillance de la contamination des canalisations, particulièrement dans la surveillance de la contamination des vannes.

Pour modéliser le développement de biofilm sur un support soumis à un flux de liquide (canalisations (1)), il est possible d'utiliser un dispositif avec un anneau (16) emprisonné dans un renflement d'un tuyau (17). Une  
5 particule magnétisable (4) est incluse en un point de l'anneau (2). Sous l'action d'un champ magnétique (Figure 8b ou 8c), on peut faire tourner cet anneau.

Si un biofilm se développe au sein du dispositif, le mouvement de l'anneau est entravé.

10 Ce dispositif modélise une vanne, le site des canalisations où se développent le plus facilement les biofilms.

L'invention est décrite dans ce qui précède à titre d'exemple. Il est entendu que l'homme du métier est à même  
15 de réaliser différentes variantes de l'invention sans pour autant sortir du cadre du brevet.



REVENDICATIONS

1. Procédé permettant de mesurer la viscosité d'un milieu de culture de microorganismes (5), caractérisé en ce qu'il comporte les étapes consistant successivement à :
- 5 a) ~~immerger~~ au moins une particule chargée électriquement, magnétique ou magnétisable ou recouverte d'au moins une couche magnétique ou magnétisable (3) dans ladite culture (4),
- 10 b) soumettre ladite culture (4) à un champ électrique, magnétique ou électromagnétique de façon à mettre ladite particule (3) en mouvement,
- c) détecter optiquement le degré de liberté de mouvement de ladite particule (3) dans ladite culture, ledit procédé n'utilisant pas de
- 15 microscope à balayage.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape b) consiste à soumettre ladite culture (4) à un
- 20 champ électromagnétique, éventuellement appliqué par impulsion.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape b) consiste à
- 25 soumettre ladite culture (4) à une augmentation progressive d'un champ électromagnétique.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit champ
- 30 électrique, magnétique ou électromagnétique est généré par des moyens générateurs de champ en mouvement.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite culture de

microorganismes s'écoule en flux constant à travers un réacteur (1) ouvert.

5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la culture (4) s'écoule à ~~travers un réacteur (1) ouvert en flux discontinu à~~ intervalle de temps donné.

10 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape c) consiste à éclairer au moyen d'une source lumineuse ladite particule (3) et de détecter le mouvement de ladite particule (3) dans ladite culture (4).

15 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la particule (3) est génératrice d'un signal.

20 9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la particule (3) est du type fluorescente ou phosphorescente ou radioactive ou chimioluminescente.

25 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, ledit procédé permettant de détecter la formation et le développement de biofilms (6) dans ladite culture (4), caractérisé en ce qu'il comprend

- 30
- une mesure de la viscosité de ladite culture (4) selon le procédé tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 10 à un temps  $t=0$  correspondant à l'ensemencement de ladite culture (4),
  - au moins une mesure à un temps  $t$  de la viscosité de ladite culture (4) selon le procédé tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 10,

- une étape de comparaison des mesures à  $t_0$  et  $t_1$ .

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ladite culture (4) est homogène ou non homogène, préférentiellement non homogène.
12. Dispositif permettant de mesurer la viscosité d'une culture de microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend :
- au moins un réacteur de culture (1) destiné à recevoir ladite culture (4) pour réaliser la détection de la formation et du développement de biofilms (6),
  - au moins une particule chargée électriquement ou magnétique ou magnétisable ou recouverte d'au moins une couche magnétique ou magnétisable immergée dans la culture (4),
  - des moyens pour générer un champ électrique ou magnétique ou électromagnétique, ledit champ étant appliqué à ladite particule (3),
  - un dispositif de détection optique du mouvement de ladite particule, autre qu'un microscope à balayage.
13. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ledit réacteur (1) présente une extrémité fermée de sorte à former un fond (2) plat.
14. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le fond (1) dudit réacteur (1) présente une ou plusieurs cavités (8, 9) ou sillons, destinés à recevoir la ou lesdites particule(s).

15. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit réacteur (1) présente une extrémité fermée de sorte à former un fond (2) hémisphérique.

5 16. Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit réacteur (1) présente deux extrémités ouvertes.

10 17. Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que le réacteur (1) est configuré pour permettre un écoulement de ladite culture (4) en flux constant ou en flux discontinu à intervalle de temps donné.

15 18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que ladite particule (3) est génératrice d'un signal détectable par ledit dispositif de détection du mouvement.

20 19. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ladite particule (3) est de type fluorescente, phosphorescente ou radioactive ou chimioluminescente.

25 20. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 12 à 19, caractérisé en ce que ladite particule (3) est configurée de telle sorte qu'elle est en position stable au repos dans ledit réacteur (1).

30 21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 12 à 20, caractérisé en ce que ladite particule (3) présente une taille sensiblement identique à la taille des microorganismes (5).

22. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 12 à 21, caractérisé en ce que ledit dispositif de détection optique comporte une source lumineuse émettant en direction de ladite particule (3), et des  
5        moyens de détection permettant de détecter le mouvement de ladite particule (3) dans le milieu de culture (4).

23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 12 à 22, ledit dispositif permettant de détecter la  
10        formation et le développement de biofilms (6) dans le milieu de culture (4), caractérisé en ce qu'il comprend :

- 15        - des moyens de mesure pour mesurer la viscosité du milieu de culture à des intervalles de temps donnés,
- des moyens de comparaison permettant de comparer les mesures obtenues.

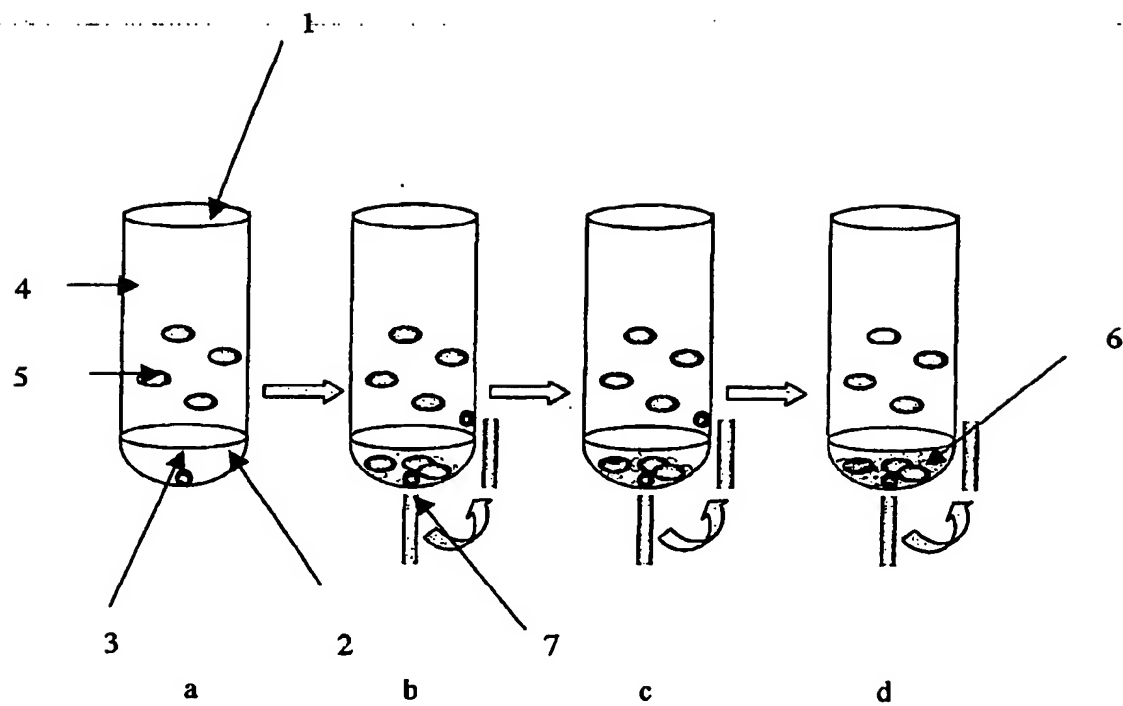


Figure 1

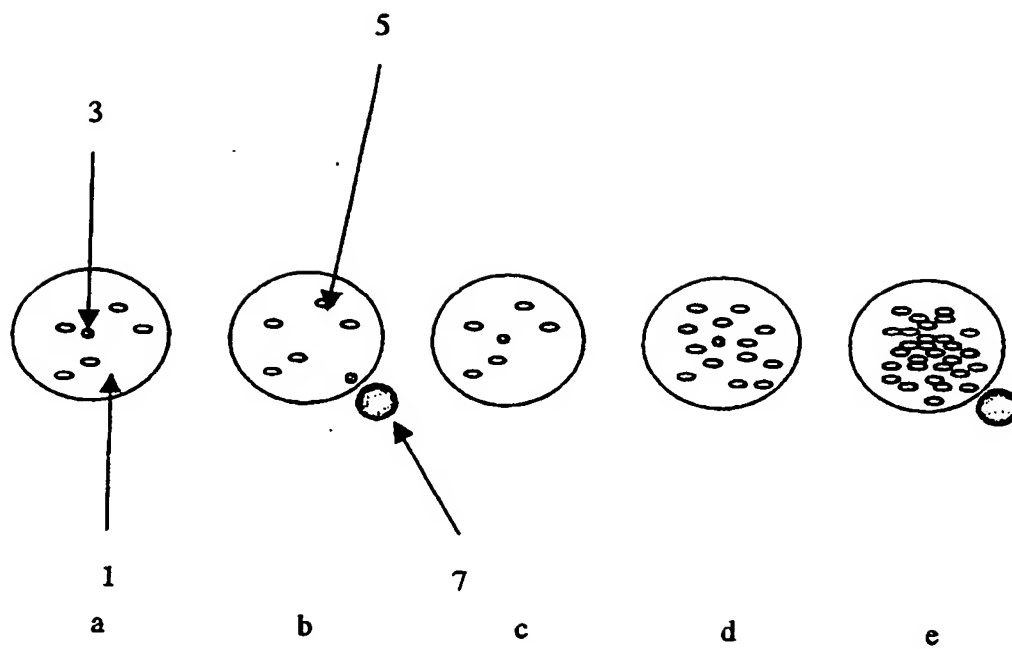


Figure 2

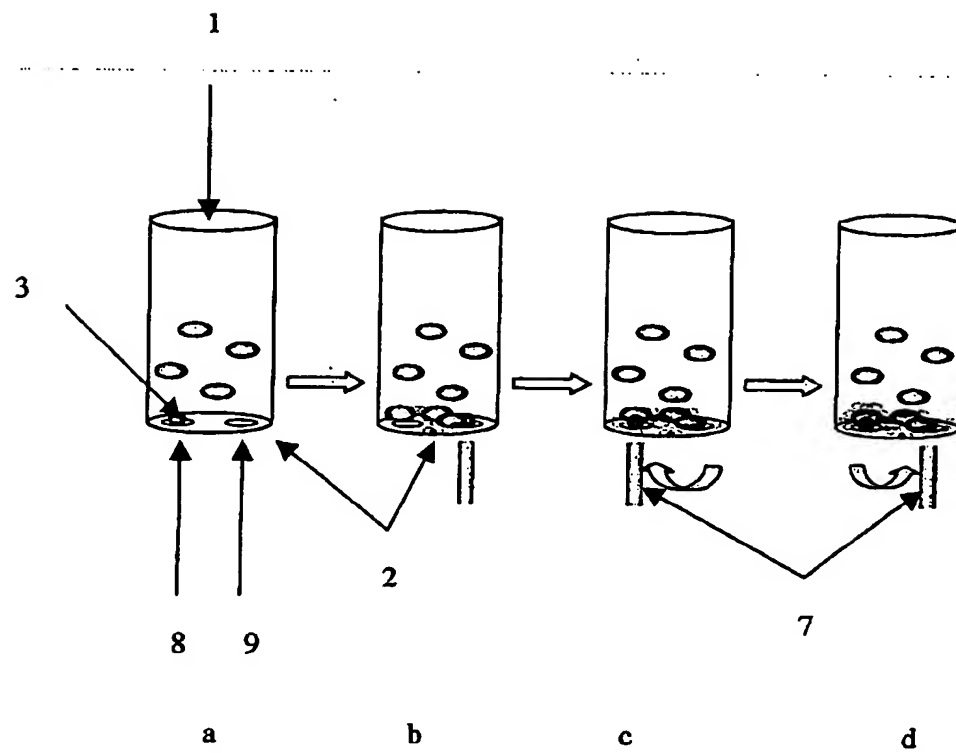


Figure 3



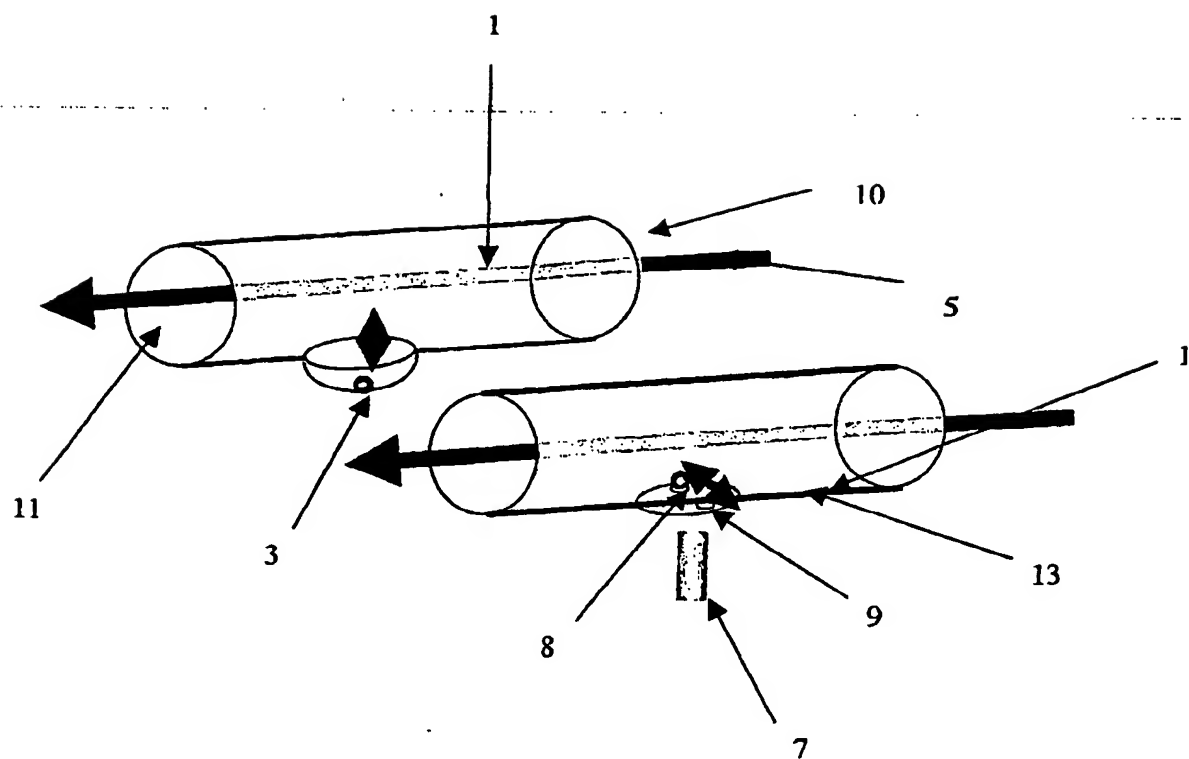


Figure 4

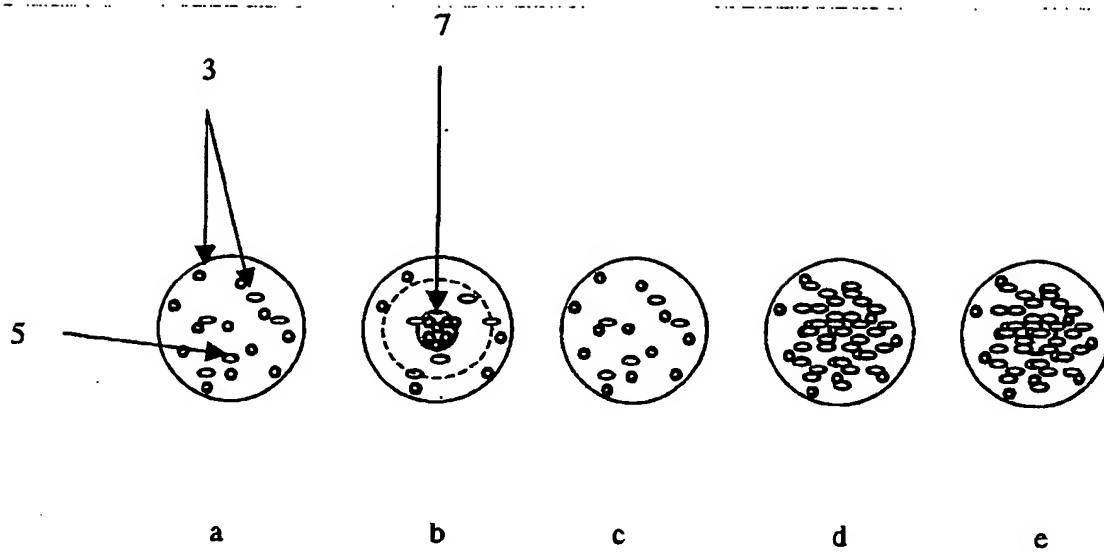


Figure 5

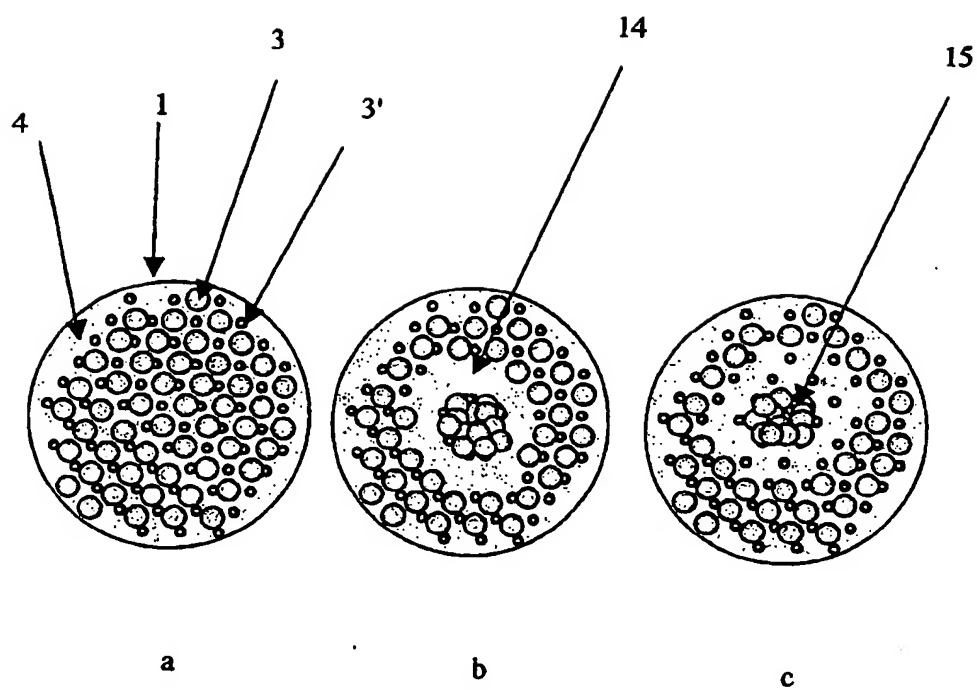


Figure 6



Figure 7

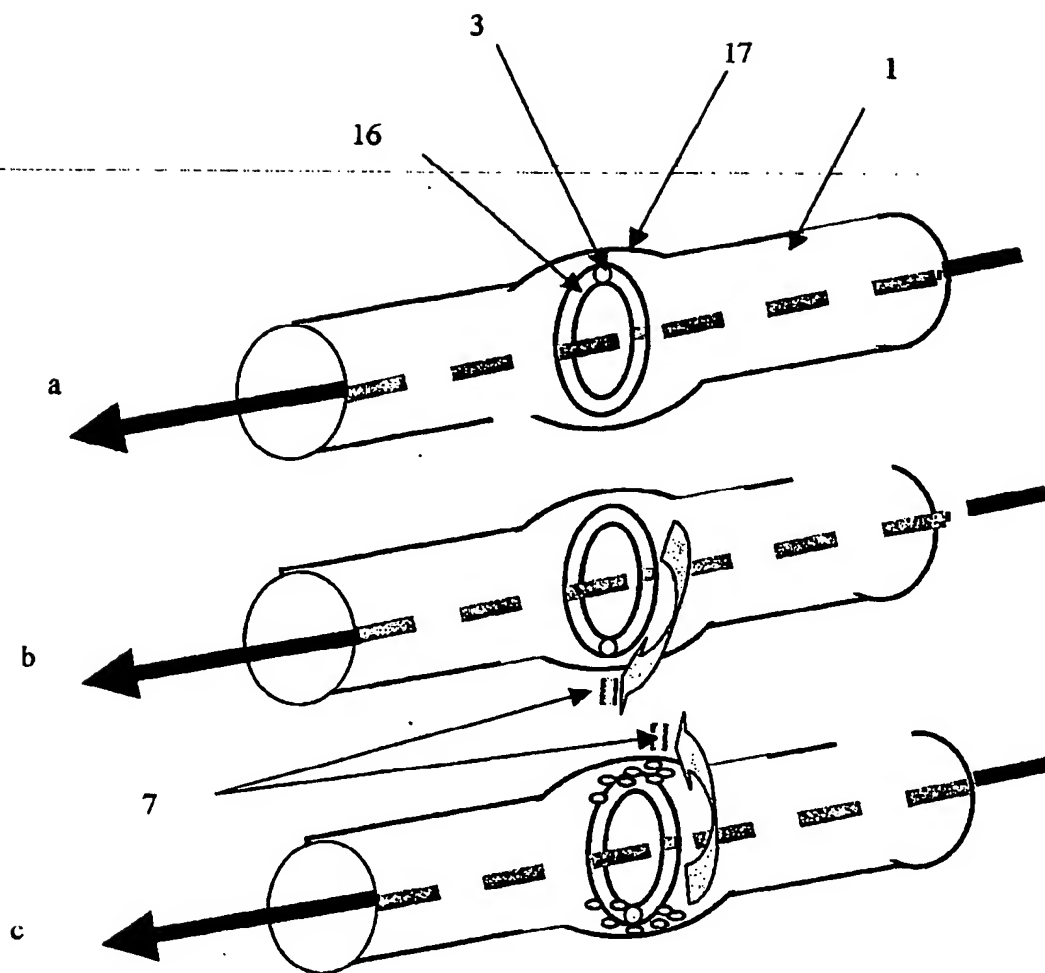


Figure 8

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR2005/000427

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 GOIN11/14 GOIN11/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 GOIN

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées            |
|-------------|---|--|
| X           | WO 01/86255 A (TUFTS COLLEGE ;NEMET BOAZ (US); SHABTAI YOSSEF (US); CRONIN GOLOMB)<br>15 novembre 2001 (2001-11-15)<br>page 2, ligne 10 - page 3, ligne 28<br>page 4, ligne 1 - page 5, ligne 31<br>page 7, ligne 18-24 | 1,2,<br>5-19,<br>21-23                   |
| X           | US 3 635 678 A (SEITZ LAMONT J ET AL)<br>18 janvier 1972 (1972-01-18)<br><br>colonne 4, ligne 18-66; figure 1<br><br>-/-  | 1-4,7,8,<br>11-13,<br>15,18,<br>20,22,23 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*I\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cantalapiedra, I

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête internationale No  
PCT/FR2005/000427

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                                     |
|---|---|-------------------------------------|
| Catégorie                                       | Justification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                       | no. des revendications visées       |
| X   | US 5 072 610 A (VILAIN PASCAL ET AL)<br>17 décembre 1991 (1991-12-17)<br><br>colonne 3, ligne 52 - colonne 5, ligne 13;<br>figure 1 | 1-4,8,<br>10-15,<br>18,20,<br>22,23 |
| A   | US 2003/012693 A1 (STOREK DAVID ET AL)<br>16 janvier 2003 (2003-01-16)<br>alinéas '0014!', '0017!', '0055!'                         | 1,12                                |
| A   | US 2002/064866 A1 (OKAMI YOSHIRO ET AL)<br>30 mai 2002 (2002-05-30)<br>alinéas '0013!', '0023!', '0046!', '0047!'                   | 1,12                                |
| A   | US 3 696 661 A (GARABRANT ARTHUR R ET AL)<br>10 octobre 1972 (1972-10-10)<br>colonne 3, ligne 52 - colonne 4, ligne 21              | 9,19                                |
| A   | US 4 081 242 A (GIROLAMI ANTOINE)<br>28 mars 1978 (1978-03-28)<br>page 4, ligne 1-3   | 1-23                                |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Numéro international No

PCT/FR2005/000427

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |    | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)  | Date de<br>publication   |
|---|----|------------------------|--|--|
| WO 0186255                                      | A  | 15-11-2001             | AU 5960301 A<br>WO 0186255 A1  | 20-11-2001<br>15-11-2001   |
| US 3635678                                      | A  | 18-01-1972             | US 3967934 A   | 06-07-1976   |
| US 5072610                                      | A  | 17-12-1991             | FR 2625563 A1<br>AT 75044 T<br>DE 3870199 D1<br>DE 323322 T1<br>DK 733388 A<br>EP 0323322 A1<br>ES 2010164 T3<br>FI 885998 A , B,<br>GR 3004821 T3<br>JP 1213571 A<br>JP 1939941 C<br>JP 6064067 B               | 07-07-1989<br>15-05-1992<br>21-05-1992<br>16-11-1989<br>01-07-1989<br>05-07-1989<br>01-11-1992<br>01-07-1989<br>28-04-1993<br>28-08-1989<br>09-06-1995<br>22-08-1994 |
| US 2003012693                                   | A1 | 16-01-2003             | US 2002048821 A1<br>US 2002164819 A1<br>WO 02088893 A2<br>WO 02088969 A1<br>WO 02088854 A1<br>WO 02089399 A1<br>US 2005108492 A1<br>US 2003044004 A1<br>US 2002191604 A1<br>US 2002191450 A1<br>US 2002194445 A1 | 25-04-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>19-05-2005<br>06-03-2003<br>19-12-2002<br>19-12-2002<br>19-12-2002               |
| US 2002064866                                   | A1 | 30-05-2002             | JP 9329602 A<br>AU 3048697 A<br>DE 69732708 D1<br>EP 0926496 A1<br>NO 985800 A<br>WO 9747969 A1  | 22-12-1997<br>07-01-1998<br>14-04-2005<br>30-06-1999<br>09-02-1999<br>18-12-1997   |
| US 3696661                                      | A  | 10-10-1972             | AUCUN  |  |
| US 4081242                                      | A  | 28-03-1978             | FR 2318421 A1<br>DE 2631950 A1<br>GB 1508946 A<br>IT 1071235 B<br>JP 52012898 A  | 11-02-1977<br>03-02-1977<br>26-04-1978<br>02-04-1985<br>31-01-1977   |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR2005/000427

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 G01N11/14 G01N11/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                    |
|------------|--|--|
| X          | WO 01/86255 A (TUFTS COLLEGE ; NEMET BOAZ (US); SHABTAI YOSSEF (US); CRONIN GOLOMB)<br>15 November 2001 (2001-11-15)<br>page 2, line 10 - page 3, line 28<br>page 4, line 1 - page 5, line 31<br>page 7, lines 18-24 | 1,2,<br>5-19,<br>21-23                   |
| X          | US 3 635 678 A (SEITZ LAMONT J ET AL)<br>18 January 1972 (1972-01-18)<br><br>column 4, lines 18-66; figure 1<br><br>-/-  | 1-4,7,8,<br>11-13,<br>15,18,<br>20,22,23 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 2005

Date of mailing of the international search report

28/06/2005

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cantalapiedra, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR2005/000427

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                                     |
|--|---|-------------------------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.               |
| X  | US 5 072 610 A (VILAIN PASCAL ET AL)<br>17 December 1991 (1991-12-17)<br><br>column 3, line 52 - column 5, line 13;<br>figure 1 | 1-4,8,<br>10-15,<br>18,20,<br>22,23 |
| A  | US 2003/012693 A1 (STOREK DAVID ET AL)<br>16 January 2003 (2003-01-16)<br>paragraphs '0014!', '0017!', '0055!                   | 1,12                                |
| A  | US 2002/064866 A1 (OKAMI YOSHIRO ET AL)<br>30 May 2002 (2002-05-30)<br>paragraphs '0013!', '0023!', '0046!',<br>'0047!          | 1,12                                |
| A  | US 3 696 661 A (GARABRANT ARTHUR R ET AL)<br>10 October 1972 (1972-10-10)<br>column 3, line 52 - column 4, line 21              | 9,19                                |
| A  | US 4 081 242 A (GIROLAMI ANTOINE)<br>28 March 1978 (1978-03-28)<br>page 4, lines 1-3  | 1-23                                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR2005/000427

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date  |
|---|----|---------------------|--|--|
| WO 0186255                                | A  | 15-11-2001          | AU 5960301 A<br>WO 0186255 A1  | 20-11-2001<br>15-11-2001   |
| US 3635678                                | A  | 18-01-1972          | US 3967934 A   | 06-07-1976   |
| US 5072610                                | A  | 17-12-1991          | FR 2625563 A1<br>AT 75044 T<br>DE 3870199 D1<br>DE 323322 T1<br>DK 733388 A<br>EP 0323322 A1<br>ES 2010164 T3<br>FI 885998 A ,B,<br>GR 3004821 T3<br>JP 1213571 A<br>JP 1939941 C<br>JP 6064067 B                | 07-07-1989<br>15-05-1992<br>21-05-1992<br>16-11-1989<br>01-07-1989<br>05-07-1989<br>01-11-1992<br>01-07-1989<br>28-04-1993<br>28-08-1989<br>09-06-1995<br>22-08-1994 |
| US 2003012693                             | A1 | 16-01-2003          | US 2002048821 A1<br>US 2002164819 A1<br>WO 02088893 A2<br>WO 02088969 A1<br>WO 02088854 A1<br>WO 02089399 A1<br>US 2005108492 A1<br>US 2003044004 A1<br>US 2002191604 A1<br>US 2002191450 A1<br>US 2002194445 A1 | 25-04-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>07-11-2002<br>19-05-2005<br>06-03-2003<br>19-12-2002<br>19-12-2002<br>19-12-2002               |
| US 2002064866                             | A1 | 30-05-2002          | JP 9329602 A<br>AU 3048697 A<br>DE 69732708 D1<br>EP 0926496 A1<br>NO 985800 A<br>WO 9747969 A1  | 22-12-1997<br>07-01-1998<br>14-04-2005<br>30-06-1999<br>09-02-1999<br>18-12-1997   |
| US 3696661                                | A  | 10-10-1972          | NONE   |  |
| US 4081242                                | A  | 28-03-1978          | FR 2318421 A1<br>DE 2631950 A1<br>GB 1508946 A<br>IT 1071235 B<br>JP 52012898 A  | 11-02-1977<br>03-02-1977<br>26-04-1978<br>02-04-1985<br>31-01-1977   |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**